

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月12日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2011

課題番号：22681019

研究課題名（和文）血管付再生組織構築のためのマイクロデバイスの開発

研究課題名（英文）Development of microdevices for engineering vascularized tissues

研究代表者

松永（津田） 行子（MATSUNAGA (TSUDA) YUKIKO）

東京大学・生産技術研究所・特任講師

研究者番号：00533663

研究成果の概要（和文）：

本研究の目的は、我々がこれまでに発案した均一直径細胞ビーズを用いて、階層構造を有する三次元組織および血管網をもった三次元組織を作り出すことである。複数種類の細胞からなる階層構造を有する三次元組織を形成するために、細胞種、ビーズの大きさについて検討を行なった。さらに三次元組織中への擬似血管構造の導入について検討を行い、マイクロゲルと細胞による新規組織構築法の足がかりを作った。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to produce a three-dimensional tissue with hierarchic structures and vascular networks by using the uniform diameter cell beads fabricated using microfluidic devices. In order to form a three-dimensional tissue with a hierarchical structure consisting of multiple cell types, we investigated the distributions of the bead size and the cell types. Furthermore, we have examined the method to introduce vascular networks within the three-dimensional tissues.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	14,300,000	4,290,000	18,590,000
2011年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
年度			
年度			
年度			
総計	20,200,000	6,060,000	26,260,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学，マイクロ・ナノデバイス

キーワード：MEMS・NEMS，マイクロバイオシステム，組織工学

1. 研究開始当初の背景

組織工学分野では、比較的薄い組織や血管網を必要としない軟骨組織等の構築が実現されているが、ミリメートル厚の組織や、腎臓・肝臓・心臓などの高次構造/機能を有する組織の構築は実現されていない。これらの組織は細胞密度が高く、組織中への酸素・栄養分の供給を担う毛細血管網が 50～200 μm

間隔で存在している。厚い組織の作製は、ミリ・センチメートルスケールに成形した生分解性の材料に細胞を播種する手法が一般的であるが、この方法は、細胞の増殖速度と材料の分解速度の不一致により、細胞密度の低い組織しか形成できない。そのため、細胞密度が高く・均一な厚い組織を作製する方法、還流しうる毛細血管網の導入方法、の開発が

重要である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々がこれまでに発案した均一直径細胞ビーズを用いて、階層構造を有する三次元組織および血管網をもった三次元組織を作り出すことである。

3. 研究の方法

本研究は、申請者の個人研究であるが、必要に応じて、研究協力者に依頼できる体制で行なった。

これまで、細胞ビーズを用いた三次元組織構築法により、線維芽細胞については、細胞密度が均一なミリメートル厚の三次元組織を構築できる条件を確立している。細胞の種類によって、増殖と細胞外マトリックス

(ECM) の分解速度は異なるため、再生したい組織に合わせたゲルビーズの大きさの制御を行う。また、三次元組織中への血管化については、あらかじめ細胞ビーズにヒト臍帯静脈由来内皮細胞などの、血管構造等つくる元になる細胞を接着させておくことで、組織中への血管形成を試みる。

4. 研究成果

(1) ここでは、組織構成ユニットとして扱う細胞ビーズによる組織構築法の基盤要素技術の確立とその有効性について検証した。直径 100 マイクロメートルのコラーゲンビーズに線維芽細胞を播種して作製した細胞ビーズで作製したミリメートル厚の組織では、24 時間後に均一な密度かつ全ての細胞が生存性を示したが、立体組織形成後 30 時間で内部にネクロシスを確認した。そこで、ビーズの大きさ可変した場合の、組織中の細胞の生存性について比較検討を行なった。ビーズの大きさを直径 300 マイクロメートルにした場合では、立体組織形成後 120 時間経過後も内部にネクロシスは観察されず、長期に培養しうるということが判明した (図 1)。つまり、

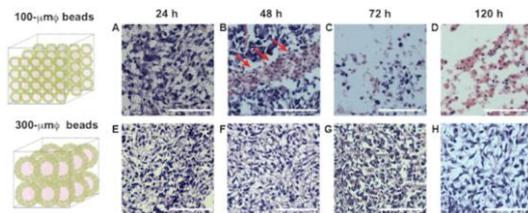


図 1: 直径が異なるコラーゲンゲルビーズで作製したミリメートル厚の三次元立体組織。直径 100 マイクロメートルのゲルビーズでは 48 時間後に組織内部で壊死が確認されたが、ビーズの直径を 300 マイクロメートルにすることで、120 時間以上生存状態を保持したまま培養できた。

細胞ビーズ内のコラーゲンビーズの大きさを可変することで、三次元組織中の細胞密度を精密に制御し、細胞の成長スピードに合わせて組織構築が可能であることを示した。また、線維芽細胞だけでなく、血管内皮細胞、肝細胞、神経細胞など、細胞種を選ばずに 2 時間以内でビーズ化し、細胞ビーズとして得られることを確認した。

(2) 階層構造の構築のために、複数種の細胞ビーズの構築を検討した。線維芽細胞だけでなく、血管内皮細胞、初代肝細胞、神経細胞、膵β細胞など、どの細胞も 2 時間以内にコラーゲンゲルビーズに接着し、組織構築のための細胞ビーズとして得られることを確認した (図 2)。次に、複数種の細胞ビーズの組み合わせにより、より生体に近い機能をもった組織の構築と数百マイクロメートルオーダーの階層的組織構造を容易に作製できることを示した。さらに、線維芽細胞を接着させたコラーゲンゲルビーズ上にヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVECs) を接着させた階層細胞ビーズを作製した。これらを鋳型に入れて三次元組織を構築すると、培養 24 時間後には組織内部に HUVEC による管腔構造を形成しうることを確認できた (図 3)。つまり、三次元組織中への効率的な毛細血管網の導入が可能であることを示した。

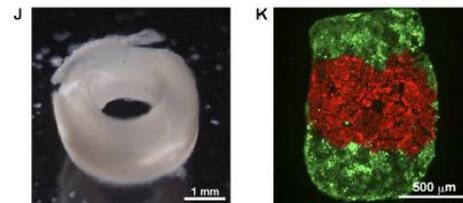


図 2: 複数種の細胞ビーズをモールドすることにより、短時間でマイクロオーダーの階層構造を有する三次元立体組織を構築することができた。

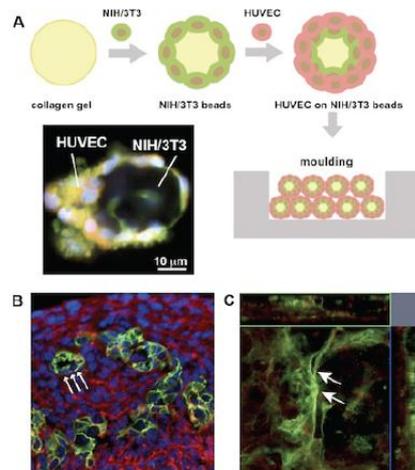


図 3 : 線維芽細胞を接着させたコラーゲンゲルビーズ上にヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVECs) を接着させた階層細胞ビーズを作製した。これらを鋳型にいて三次元組織を構築すると、培養 24 時間後には組織内部に HUVEC による管腔構造を形成しうることを確認できた。

以上の結果から、マイクロスケールで制御したゲルによる新規組織構築法の有効性を示し、組織構築のためのマイクロ組織ユニット (細胞ビーズ) の要素技術が確立されたと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Y.T. Matsunaga*, Y. Morimoto*, and Shoji Takeuchi: Molding cell beads for rapid construction of macroscopic 3D tissue architecture, *Advanced Materials*, 23, H90-H94 (2011). (*: equal contribution) (査読有)
DOI: 10.1002/adma.201190040

[学会発表] (計 13 件)

1. Y.T. Matsunaga, "Fabrication of 3D micro-scaffolds to design hierarchic tissue structures", 日本機械学会北海道支部バイオメカニクス懇話会第 7 回講演会, 2012.01.16, (北海道, 北海道大学)
2. Y.T. Matsunaga, "Engineering complex tissues using MEMS technology", MRS-J, 2011.12.21 (神奈川県, 横浜開港記念会館)
3. 松永行子, "マイクロ加工技術を利用したボトムアップ三次元組織構築", 第 28 回医用高分子研究会講座, 2011.11.24, (東京, 東京医科歯科大学)
4. Y.T. Matsunaga, "Engineering tissues from the bottom up: Designing microarchitectural features of tissues", ICFD-2011, 2011.11.10, (宮城県, ホテルメトロポリタン仙台)
5. 松永行子, "バイオ構造システム工学 — 生物学的解析のための複合生体組織システムの構築 — Bio-Architectural System Engineering: Fabrication of 3D Complex Tissues for Biological Analysis", 第 49 回日本生物物理学会年会「シンポジウム: 分子ロボティクスの勃興: 人工分子複合体や分子相互作用ネットワークを設計して創って動かす」, 2011.09.17, (兵庫県, 兵庫県立大学)
6. 松永行子, "細胞プリンティングによる三次元組織構築", 東京大学駒場 II リサーチキャンパス公開・工学とバイオ若手研究者フォーラム, 2011.06.03, (東京, 東大生研)

7. 松永行子, "ボトムアップ組織工学: MEMS で生体組織を組み立てる", 第 9 回バイオレオロジー・リサーチ・フォーラム, 2011.06.02, (大阪府, 関西大学)
8. 津田行子, 竹内昌治, コラーゲン細胞ビーズによる高速三次元組織構築, 第 32 回日本バイオマテリアル学会, 2010.12.1, (広島, グランドプリンスホテル広島)
9. 松永行子, "ボトムアップ組織構築のための細胞集団のマイクロ制御技術", 第 3 回定量生物学の会「セッション: 工学技術と定量生物学」, 2010.11.27, (東京, 東京大学・生産技術研究所)
10. 青柳星見, 松永行子, 松井等, 大久保有希, 竹内昌治, "「肝臓」をつくる", 細胞を創る研究会 3.0, 2010.11.12, (東京, 東京大学・生産技術研究所)
11. Yukiko Tsuda, Hiroaki Onoe, Shoji Takeuchi, "Bead-based Rapid Construction of Heterogeneous 3D Tissue Architecture", MicroTAS 2010, 2010.10.5, (オランダ, グローニンゲン)
12. 津田行子, 森本雄矢, 竹内昌治, "均一直径細胞ビーズによる三次元組織構築", 第 21 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2010.6.10, (東京, 東京大学, 本郷キャンパス, 小柴ホール)
13. 津田行子, 竹内昌治, "創薬診断および再生医療のための均一直径細胞ビーズ", 第 17 回 HAB 研究機構学術年会, 2010.5.22, (東京, 昭和大学薬学部)

[図書] (計 1 件)

1. 松永行子, 佐藤暁子, 竹内昌治: 細胞を操作して組織・臓器をつくる~生命を宿したアート~, 193-199, 羊土社, 細胞を創る・生命システムを創る (実験医学増刊), 2011, Vol. 29(7). (分担執筆)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 血管様構造物を含む三次元細胞培養物
発明者: 松永行子, 尾上弘晃, 竹内昌治
権利者: 東京大学
種類: 特願
番号: 2010-273705
出願年月日: 2010. 12. 8
国内外の別: 国内

[その他]

・研究室ホームページ
<http://www.matlab.iis.u-tokyo.ac.jp/>

- ・アウトリーチ活動
1. 東大で先端科学に触れよう! ~ジュニア

科学者育成プログラム～
<http://www.youtube.com/watch?v=PxY6xOkEIJg>

・新聞報道

1. 2011.3.15 日刊工業新聞: 生きた細胞を3D高速形成 (24面)
2. 2011.3.7 産経新聞: 産業用ロボットの改良の装置で3次元の細胞組織を自動形成 (9面)
3. 2011.3.2 日経新聞: 細胞の立体組織思い通りの形に (38面)
4. 2011.3.2 日経産業新聞: 細胞から組織、自動成形 (6面)
5. 2011.3.2 NHK おはようニッポン: 細胞を自在に作る技術開発
6. 2011.3.1 時事通信: 細胞の3D形成に成功—高速かつ正確、再生医療にも

6. 研究組織

(1)研究代表者

松永 (津田) 行子 (MATSUNAGA (TSUDA)
YUKIKO)

東京大学・生産技術研究所・特任講師
研究者番号: 00533663

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: